



Dendeng sapi



© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Komposisi	1
5 Syarat mutu.....	1
6 Pengambilan contoh	2
7 Cara uji	2
8 Syarat lulus uji.....	3
9 Higiene.....	3
10 Pengemasan.....	3
Lampiran A (normatif) Cara uji dendeng sapi	4
Bibliografi	40

Prakata

Standar Nasional Indonesia *Dendeng sapi* ini merupakan revisi SNI 01 – 2908 – 1992 *Dendeng sapi*. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut :

- Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam metode uji dan persyaratan mutu;
- Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku.
- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan dan diversifikasi produk industri daging sapi.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan ketentuan pada :

1. Undang-Undang Republik Indonesia No.5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-Undang Republik Indonesia No.7 Tahun 1996 tentang Pangan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen
4. Undang-Undang Republik Indonesia No.36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
5. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No.69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No.28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.
7. Peraturan Menteri Kesehatan No. 722/MENKES/PER/IX/1988, tentang Bahan Tambahan Makanan atau revisinya.
8. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No. 24 / M-IND/ 2/ 2010 tentang Pencantuman Logo Tara dan Kode Daur Ulang Pada Kemasan Pangan Dari Plastik.
9. Keputusan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor 75/ M-IND/ 7/ 2010 tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.
10. Surat Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
11. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemarkan Mikroba dan Kimia dalam Makanan.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis 67-04, Makanan dan Minuman, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 18 Oktober 2010 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 27 April 2011 sampai 26 Juni 2011 dengan hasil akhir RASNI.

Dendeng sapi

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji dendeng sapi.

Standar ini hanya berlaku untuk dendeng sapi mentah.

2 Acuan normatif

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

3 Istilah dan definisi

3.1

dendeng sapi

produk makanan yang berbentuk lempengan terbuat dari daging sapi segar dan atau daging sapi beku, yang diiris atau digiling, ditambah bumbu dan dikeringkan dengan sinar matahari atau alat pengering, dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diizinkan

4 Komposisi

4.1 Bahan baku

daging sapi

4.2 Bahan pangan lain

bahan pangan yang diizinkan untuk dendeng sapi sesuai dengan ketentuan yang berlaku

4.3 Bahan tambahan pangan

bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk dendeng sapi sesuai dengan ketentuan yang berlaku

5 Syarat mutu

Syarat mutu dendeng sapi sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 – Syarat mutu dendeng sapi

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	Normal
1.2	Warna	-	Normal

Tabel 1 (lanjutan)

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
2	Kadar air (b/b)	%	maks. 12
3	Kadar lemak (b/b)	%	maks. 3
4	Kadar protein (Nx 6,25) (b/b)	%	min. 18
5	Abu tidak larut dalam asam(b/b)	%	maks. 0,5
6	Cemaran logam		
6.1	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,3
6.2	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 1,0
6.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40,0
6.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03
7	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 0,5
8	Cemaran mikroba		
8.1	Angka lempeng total	koloni/g	maks. 1×10^5
8.2	<i>Escherichia coli</i>	APM/g	< 3
8.3	<i>Salmonella</i> sp.	-	negatif / 25 g
8.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	koloni/g	maks. 1×10^2
8.5	<i>Bacillus cereus</i>	koloni/g	maks. 1×10^3

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428

7 Cara uji

Cara uji untuk dendeng sapi seperti di bawah ini:

- Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
 - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
 - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.2
- Cara uji kadar air sesuai Lampiran A.3
- Cara uji kadar lemak sesuai Lampiran A.4
- Cara uji kadar protein (Nx6,25) sesuai Lampiran A.5
- Cara uji abu tidak larut dalam asam sesuai Lampiran A.6
- Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.7
 - Cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran A.7.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.7.2
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.7.3

- i) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.8
- j) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.9
 - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.9.1
 - Cara uji angka lempeng total sesuai Lampiran A.9.2
 - Cara uji *Escherichia coli* sesuai Lampiran A.9.3
 - Cara uji *Salmonella* sp. sesuai Lampiran A.9.4
 - Cara uji *Staphylococcus aureus* sesuai Lampiran A.9.5
 - Cara uji *Bacillus cereus* sesuai Lampiran A.9.6

8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Pasal 5.

9 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

10 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

11 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.

Lampiran A
(normatif)
Cara uji dendeng sapi

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan contoh dendeng sapi dan ambil contoh secara aseptik sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan contoh dendeng sapi dan ambil contoh secukupnya, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia

Buka kemasan contoh dendeng sapi dan ambil contoh sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.2 Keadaan

A.2.1 Bau

A.2.1.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman (hidung) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

A.2.1.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 (tiga) orang panelis yang terlatih atau 1 (satu) orang tenaga ahli.

A.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.2 Warna

A.2.2.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera penglihatan (mata) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

A.2.2.2 Cara kerja

- Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- Amati warna contoh uji; dan
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- Jika tidak terlihat warna asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- jika terlihat warna asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.3 Kadar air

A.3.1 Prinsip

Kadar air dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu $(125 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

A.3.2 Peralatan

- Oven terkalibrasi;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Desikator yang berisi desikan; dan
- Pinggan aluminium bertutup dengan diameter 50 mm dan tinggi/ kedalaman kurang dari atau sama dengan 40 mm.

A.3.3 Cara kerja

- Panaskan pinggan aluminium beserta tutupnya dalam oven pada suhu $(125 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama 1 jam, kemudian dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang dengan neraca analitik (W_0);
- masukkan 2 g contoh ke dalam pinggan, tutup, dan timbang (W_1);
- panaskan pinggan yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup pinggan disamping pinggan di dalam oven pada suhu $(125 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama 2 sampai dengan 4 jam setelah suhu oven $(125 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- tutup pinggan ketika masih di dalam oven, pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 20 menit sampai dengan 30 menit, sehingga suhunya sama dengan suhu ruang, kemudian timbang (W_2);
- lakukan pekerjaan duplo; dan
- hitung kadar air dalam contoh.

A.3.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air (\%)} = \left(\frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \right) \times 100 \%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot pinggan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot pinggan, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot pinggan, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

A.3.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan (duplo) maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar air. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka uji harus diulang kembali.

A.4 Kadar lemak

A.4.1 Prinsip

Hidrolisis lemak dalam contoh menggunakan HCl kemudian diekstraksi dengan petroleum eter. Ekstrak petroleum eter yang diperoleh kemudian diuapkan sampai kering dan kadar lemak dihitung secara gravimetri.

A.4.2 Peralatan

- Alat *Soxhlet* lengkap;
- Oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Penangas air;
- Thimble* ekstraksi atau selongsong kertas saring ukuran (33 x 80) mm;
- Desikator yang berisi desikan;
- Labu lemak 250 ml;
- Gelas piala 500 ml atau 300 ml;
- Kaca arloji; dan
- Kertas saring bebas lemak.

A.4.3 Pereaksi

- Larutan asam klorida (HCl) 8 M;
- Petroleum eter atau heksan;
- Larutan perak nitrat (AgNO₃) 0,1 M;
larutkan (17,0 ± 0,1) g (AgNO₃) p.a. di dalam 1 000 ml air suling.
- Air suling; dan
- Batu didih.

A.4.4 Cara kerja

A.4.4.1 Hidrolisis

- Timbang 4 g sampai dengan 5 g contoh (W₀) yang telah dipersiapkan dengan teliti ke dalam gelas piala 500 ml atau 300 ml;
- tambahkan 45 ml air suling mendidih dengan perlahan sambil diaduk hingga homogen;
- tambahkan 55 ml HCl 8 M (2 bagian HCl ditambah 1 bagian air) dan beberapa butir batu didih);
- tutup gelas piala tersebut dengan kaca arloji lalu dididihkan perlahan-lahan selama 15 menit;
- bilas kaca arloji dengan air suling dan masukkan air pembilas tersebut ke dalam gelas piala;
- saring endapan menggunakan kertas saring bebas lemak;
- bilas gelas piala 3 kali dengan air suling, lakukan pencucian hingga bebas klor yang dapat ditentukan dengan penambahan 1 tetes sampai dengan 3 tetes AgNO₃ 0,1 M pada filtrat, jika tidak terdapat endapan putih (AgCl) maka telah bebas klor; dan
- pindahkan kertas saring serta isinya ke dalam *thimble* ekstraksi atau selongsong kertas saring bebas lemak dan keringkan 6 jam pada suhu 100 °C sampai dengan 101 °C.

A.4.4.2 Ekstraksi

- Keringkan labu lemak yang berisi beberapa butir batu didih selama 1 jam;
- dinginkan dalam desikator dan timbang (W_1), sambungkan dengan alat ekstraksi *Soxhlet*;
- masukkan *thimble* ekstraksi atau selongsong kertas saring ke dalam *Soxhlet* (sebaiknya *thimble* ditopang *glass bead*), bilas piala yang digunakan untuk hidrolisis dan yang digunakan waktu pengeringan dengan petroleum eter atau heksan sebanyak 3 x 5 ml, tuangkan ke dalam *Soxhlet*, kemudian tuangkan petroleum eter sebanyak 2/3 kapasitas labu di atas penangas;
- ekstrak selama 4 jam dengan kecepatan ekstraksi lebih dari 30 kali;
- keringkan labu lemak beserta lemak di dalam oven pada suhu 100 °C sampai dengan 101 °C selama 1,5 jam sampai dengan 2 jam;
- dinginkan dalam desikator dan timbang (W_2); dan
- ulangi pengeringan sampai perbedaan penimbangan bobot lemak yang dilakukan berturut-turut kurang dari 0,05 %.

A.4.5 Perhitungan

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \frac{W_2 - W_1}{W} \times 100\%$$

Keterangan:

- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
 W_1 adalah bobot labu lemak kosong, dinyatakan dalam gram (g);
 W_2 adalah bobot labu lemak kosong dan lemak, dinyatakan dalam gram (g).

A.4.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan (duplo) maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil lemak. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka uji harus diulang kembali.

A.5 Kadar protein ($N \times 6,25$)

A.5.1 Prinsip

Contoh didestruksi untuk melepaskan nitrogen dari protein sebagai garam amonium. Garam amonium tersebut diuraikan menjadi NH_3 pada saat destilasi menggunakan NaOH. NH_3 yang dibebaskan dan diikat dengan asam borat menghasilkan ammonium borat yang secara kuantitatif dititrasi dengan larutan baku asam sehingga diperoleh total nitrogen. Kadar protein diperoleh dari hasil kali total nitrogen dengan 6,25.

A.5.2 Peralatan

- Alat destilasi Kjeldahl konvensional atau otomatis;
- Alat destruksi;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik; dan
- Buret 10 ml terkalibrasi.

A.5.3 Pereaksi

- Katalis tablet mengandung 3,5 g Kalium Sulfat (K_2SO_4) dan 0,175 g Merkuri Oksida (HgO)

- b) Larutan indikator *methyl red* (MR) / *bromocresol green* (BCG);
larutkan 0,2 g *methyl red* dengan etanol 95 % menjadi 100 ml. Larutkan 1,0 g *bromocresol green* dengan etanol 95 % menjadi 500 ml. Campurkan 1 bagian larutan *methyl red* dan 5 bagian larutan *bromocresol green* dalam gelas piala lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- c) Larutan asam borat (H_3BO_3) 4 %;
timbang 4 g H_3BO_3 , larutkan ke dalam air yang mengandung 0,7 ml larutan indikator *methyl red* 1 % *bromocresol green* 1 %, encerkan hingga 100 ml, aduk, (larutan akan berwarna kuning terang) dan pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- d) Larutan natrium hidroksida - natrium thiosulfat ($\text{NaOH} - \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$);
larutkan 2 000 g hablur NaOH dan 125 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ dengan air suling menjadi 5 000 ml, simpan ke dalam botol bertutup karet.
- e) Larutan standar asam klorida, HCl 0,2 M;
- f) Larutan hidrogen peroksida, H_2O_2 30 sampai dengan 35 %;
- g) Larutan asam sulfat, H_2SO_4 pekat;
- h) Batu didih.

A.5.4 Cara kerja

- a) Timbang secara teliti 1 sampai dengan 2 g contoh (W) ke dalam labu *Kjeldahl*, tambahkan 2 katalis tablet atau 1 g campuran katalis selen, 8 sampai dengan 10 batu didih dan 25 ml H_2SO_4 pekat;
- b) panaskan campuran dalam pemanas listrik sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijau-hijauan. Lakukan dalam lemari asam atau lengkapi alat destruksi dengan unit pengisapan asap;
- c) biarkan dingin, kemudian encerkan dengan air suling secukupnya;
- d) tambahkan 50 sampai dengan 75 ml larutan NaOH 30 % (periksa dengan indikator PP sehingga campuran menjadi basa);
- e) suling selama 5 menit sampai dengan 10 menit atau saat larutan destilat telah mencapai kira-kira 150 ml, dengan penampung destilat adalah 50 ml larutan H_3BO_3 4 %;
- f) bilas ujung pendingin dengan air suling;
- g) titar larutan campuran destilat dengan larutan HCl 0,2 M; dan
- h) kerjakan penetapan blanko.

A.5.5 Perhitungan

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,007 \times 6,25 \times 100 \%}{W}$$

Keterangan:

- V_1 adalah volume HCl 0,2 N untuk titrasi contoh, dinyatakan dalam mililiter (ml);
- V_2 adalah volume HCl 0,2 N untuk titrasi blanko, dinyatakan dalam mililiter (ml);
- N adalah normalitas larutan HCl , dinyatakan dalam Normalitas (N);
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam miligram (mg);
- 14,007 adalah bobot atom Nitrogen;
- 6,25 adalah faktor protein untuk daging.

A.5.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar protein. Jika kisaran lebih besar dari 5 %, maka uji harus diulang kembali.

A.6 Abu tidak larut dalam asam

A.6.1 Prinsip

Contoh diabukan pada suhu 550 °C, kemudian dilarutkan dengan HCl dan disaring sebagai abu yang tidak larut dalam asam.

A.6.2 Peralatan

- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Penangas air;
- Desikator berisi desikan;
- Cawan porselen/silika/platina volume 30 sampai dengan 50 ml; dan
- Kertas saring tidak berabu dengan *particle retention* 2,5 µm.

A.6.3 Perekasi

- Asam klorida (HCl 2 : 5); dan
- Larutan perak nitrat (AgNO₃).

A.6.4 Cara kerja

- Masukkan cawan ke dalam tanur terkalibrasi pada suhu 550 °C selama 30 menit, kemudian dinginkan dengan desikator dan timbang (W_0);
- timbang secara teliti 2 g contoh (W_1) ke dalam cawan porselen/silika/platina yang sudah diketahui bobotnya;
- panaskan dalam tanur pada suhu 550 °C selama 30 menit;
- teteskan sedikit air, uapkan hingga mengering, kemudian masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 550 °C sampai diperoleh abu berwarna putih;
- bila pada tahap (c) abu sudah berwarna putih, dinginkan, tambahkan 25 ml larutan HCl, tutup dengan gelas arloji, dan panaskan dalam penangas air selama 5 menit;
- dinginkan dan selanjutnya saring dengan kertas saring;
- cuci residu dengan air panas sehingga hasil saringan bebas dari HCl yang diuji dengan larutan perak nitrat;
- simpan dan masukkan kertas saring dan residu dalam cawan;
- abukan dalam tanur pada suhu 550 °C, dinginkan dalam desikator dan timbang (W_2);
- ulangi lagi pengabuan, dinginkan dan timbang lagi;
- ulangi proses ini sehingga perbedaan antara dua penimbangan kurang dari 1 mg;
- catat hasil penimbangan yang terendah;
- lakukan pekerjaan duplo; dan
- hitung kadar abu tidak larut asam dalam contoh.

A.6.5 Perhitungan

$$\text{Abu tidak larut dalam asam (\%)} = \left[\frac{W_2 - W_0}{W_1} \right] \times 100$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot cawan kosong, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot cawan + abu, dinyatakan dalam gram (g).

A.6.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil lemak. Jika kisaran lebih besar dari 10 %, maka uji harus diulang kembali.

A.7 Cemaran logam

A.7.1 Kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

A.7.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

A.7.1.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;
- Pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi;
- Labu ukur 1 000 ml, 100 ml, dan 50 ml, terkalibrasi;
- Gelas ukur 10 ml;
- Gelas piala 250 ml;
- Botol polipropilen;
- Cawan porselen/platina/kwarsa 50 ml sampai dengan 100 ml; dan
- Kertas saring tidak berabu dengan *particle retention* 20 µm sampai dengan 25 µm.

A.7.1.3 Pereaksi

- Asam nitrat (HNO₃) pekat;
- Asam klorida (HCl) pekat;
- Larutan asam nitrat (HNO₃) 0,1 N;
encerkan 7 ml HNO₃ pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 ml sampai tanda garis.
- Larutan asam klorida (HCl) 6 N;
encerkan 500 ml HCl pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 ml sampai tanda garis.
- Larutan baku 1 000 µg/ ml Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 ml HNO₃ pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis, atau bisa digunakan larutan baku Cd 1 000 µg/ ml siap pakai.
- Larutan baku 200 µg/ ml Cd;
pipet 10 ml larutan baku 1000 µg/ ml Cd ke dalam labu ukur 50 ml kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 µg/ ml Cd.
- Larutan baku 20 µg/ ml Cd;
pipet 10 ml larutan baku 200 µg/ ml Cd ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 µg/ ml Cd.

- h) Larutan baku kerja Cd;
pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml, 0,5 ml, 1 ml; 2 ml; 4 ml; 7 ml dan 9 ml larutan baku 20 µg/ ml kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/ ml; 0,1 µg/ ml; 0,2 µg/ ml; 0,4 µg/ ml; 0,8 µg/ ml; 1,4 µg/ ml dan 1,8 µg/ ml Cd.
- i) Larutan baku 1 000 µg/ ml Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 ml HNO₃ pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 ml kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis, atau bisa digunakan larutan baku Pb 1 000 µg/ ml siap pakai.
- j) Larutan baku 50 µg/ ml Pb; dan
pipet 5,0 ml larutan baku 1 000 µg/ ml Pb ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 µg/ ml.
- k) Larutan baku kerja Pb;
pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml, 0,2 ml; 0,5 ml; 1 ml; 2 ml; 3 ml dan 4 ml larutan baku 50 µg/ ml kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/ ml; 0,1 µg/ ml; 0,25 µg/ ml; 0,5 µg/ ml; 1,0 µg/ ml; 1,5 µg/ ml dan 2,0 µg/ ml PA.

A.7.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (W) dengan teliti dalam cawan porselen/platina/kuarsa;
- b) tempatkan cawan berisi contoh di atas pemanas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur (450 ± 5) °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO₃ pekat kira-kira 0,5 ml sampai dengan 3 ml;
- e) keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu (450 ± 5) °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO₃ pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 ml HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas pemanas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO₃ 0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 ml kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan aquabides (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring, ke dalam botol polipropilen;
- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorbansi larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/ ml) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.

A.7.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g}/\text{ml}$);

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.7.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan (duplo) maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.7.2 Timah (Sn)

A.7.2.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

A.7.2.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;
- Labu ukur 1 000 ml, 100 ml, dan 50 ml, terkalibrasi;
- Pipet ukur 10 ml dan 5 ml, berskala 0,1 ml, terkalibrasi;
- Erlenmeyer 250 ml;
- Gelas ukur 50 ml; dan
- Gelas piala 250 ml.

A.7.2.3 Pereaksi

- Larutan kalium klorida (KCl) 10 mg/ ml K;
larutkan 1,91 g KCl dengan air suling menjadi 100 ml.
- Asam nitrat (HNO_3) pekat;
- Asam klorida (HCl) pekat;
- Larutan baku 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sn; dan
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 ml HCl pekat dalam labu ukur 1 000 ml, tambahkan 200 ml air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku kerja Sn.
pipet 10 ml HCl pekat dan 1,0 ml larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 ml. Tambahkan masing-masing 0 ml; 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml dan 2,5 ml larutan baku 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dan 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sn.

A.7.2.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (W) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 ml, tambahkan 30 ml HNO₃ pekat dan biarkan 15 menit;
- panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 ml sampai dengan 6 ml atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- angkat Erlenmeyer dari pemanas listrik, tambahkan 25 ml HCl pekat, dan panaskan selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl₂ berhenti;
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 ml sampai dengan 15 ml;
- tambahkan 40 ml air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 ml, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 ml aquabides (V);
- tambahkan 1,0 ml KCl, dinginkan pada suhu ruang, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis dan saring;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbansi larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi N₂O-C₂H₂;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/ ml) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Sn dalam contoh;

A.7.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/ml)
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml); dan
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.7.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan duplo) maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan timah (Sn). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.7.3 Merkuri (Hg)

A.7.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH₄ atau SnCl₂ dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbansi Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimal 253,7 nm.

A.7.3.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Microwave digester*;

- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;
- e) Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- f) Tabung destruksi;
- g) Labu destruksi 250 ml berdasar bulat;
- h) Labu ukur 1 000 ml, 500 ml, 100 ml, dan 50 ml terkalibrasi;
- i) Gelas ukur 25 ml;
- j) Pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi; dan
- k) Gelas piala 500 ml.

A.7.3.3 Pereaksi

- a) Larutan asam sulfat (H_2SO_4) 9 M;
- b) Larutan asam nitrat (HNO_3) 7 M;
- c) Campuran asam nitrat: asam perklorat ($\text{HNO}_3 : \text{HClO}_4$) 1 : 1;
- d) Hidrogen peroksida (H_2O_2) pekat;
- e) Larutan natrium molibdat ($\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 2 %;
- f) Larutan pereduksi;
campurkan 50 ml H_2SO_4 dengan 300 ml air suling dalam gelas piala 500 ml dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidrosilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- g) Larutan natrium borohidrida (NaBH_4);
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 ml.
- h) Larutan pengencer;
masukkan 300 ml sampai dengan 500 ml air suling ke dalam labu ukur 1 000 ml dan tambahkan 58 ml HNO_3 kemudian tambahkan 67 ml H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- i) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hg;
larutkan 0,135 4 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 ml air suling dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- j) Larutan baku 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hg; dan
pipet 1 ml larutan baku 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hg ke dalam labu ukur 1 000 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis, kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- k) Larutan baku kerja Hg; dan
pipet masing-masing 0,25 ml; 0,5 ml; 1 ml; dan 2 ml larutan baku 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,002 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,005 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hg.
- l) Batu didih.

A.7.3.4 Cara kerja

A.7.3.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh (W) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 ml H_2SO_4 9 M, 20 ml HNO_3 7 M, 1 ml larutan natrium molibdat 2 %, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;

- c) tambahkan 20 ml campuran asam nitrat: asam perklorat (HNO_3 : HClO_4) 1:1 melalui pendingin;
- d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- e) tambahkan 10 ml air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- f) didihkan lagi selama 10 menit;
- g) matikan pemanas listrik dan cuci pendingin dengan 15 ml air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- i) pipet 25 ml larutan di atas ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- j) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- k) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- l) baca absorbansi larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- m) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g}/\text{ml}$) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- n) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- o) lakukan pengerjaan duplo; dan
- p) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.7.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 ml HNO_3 , 1 ml H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- e) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- f) baca absorban larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- g) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g}/\text{ml}$) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- i) lakukan pengerjaan duplo; dan
- j) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.7.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi merkuri (Hg) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g}/\text{ml}$);
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
 fp adalah faktor pengenceran.

A.7.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan (duplo) maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan merkuri (Hg). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.8 Cemaran arsen (As)

A.8.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 193,7 nm.

A.8.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Burner* atau *bunsen*;
- Labu *Kjeldahl* 250 ml;
- Labu terbuat dari borosilikat berdasar bulat 50 ml;
- Labu ukur 1 000 ml, 500 ml, 100 ml, dan 50 ml terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 ml;
- Pipet volumetrik 25 ml terkalibrasi;
- Pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi;
- Cawan porselen 50 ml; dan
- Gelas piala 200 ml.

A.8.3 Perekasi

- Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- Asam sulfat, H_2SO_4 pekat;
- Asam perklorat, HClO_4 pekat;
- Ammonium oksalat, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 4 %;
 larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 ml.
- Larutan asam klorida, HCl 8 M;
 larutkan 66 ml HCl pekat kedalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 %;
 timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam gelas piala 200 ml dan tambahkan 100 ml HCl pekat. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.

- i) Larutan kalium iodida, KI 20 %;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- j) Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/ ml;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 ml H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 ml HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 ml dengan air suling;
- k) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ As;
larutkan 1,320 3 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20 % dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 000 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- l) Larutan baku 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ As;
pipet 10 ml larutan baku As 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ As.
- m) Larutan baku 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ As; dan
pipet 1 ml larutan baku As 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ As.
- n) Larutan baku kerja As.
pipet masing-masing 1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml dan 5,0 ml larutan baku 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ As ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,02 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,03 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dan 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ As.

A.8.4 Cara kerja

A.8.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (W) ke dalam labu *Kjeldahl* 250 ml, tambahkan 5 ml sampai dengan 10 ml HNO_3 pekat dan 4 ml sampai dengan 8 ml H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 2 ml HClO_4 70 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan HClO_4 , tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 ml H_2O dan 5 ml $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu;
- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 ml larutan diatas dan tambahkan 2 ml HCl 8 M, 0,1 ml KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi (NaBH_4) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- j) baca absorbansi larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g}/\text{ml}$) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

A.8.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 ml HNO₃, 1 ml H₂O₂ kemudian tutup rapat.
- masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- pipet 10 ml larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 ml, tambahkan 1 ml larutan Mg(NO₃)₂, Uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu 450 °C (± 1 jam);
- dinginkan, larutkan dengan 2,0 ml HCl 8 M, 0,1 ml KI 20 % dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- siapkan NaBH₄ dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- tuangkan larutan baku kerja As 0,01 µg/ ml; 0,02 µg/ ml; 0,03 µg/ ml; 0,04 µg/ ml; 0,05 µg/ ml serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan *burner* atau *bunsen* serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- baca nilai absorbansi tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As (µg/ ml) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan As dalam contoh.

A.8.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As), (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi arsen (As) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per miliiliter (µg/ ml)
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

A.8.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan (duplo) maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan arsen (As). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka uji harus diulang kembali.

A.9 Cemarkan mikroba

A.9.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji angka lempeng total (ALT), *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus*

A.9.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

A.9.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi (blender) dengan kecepatan 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- Otoklaf;
- Neraca kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Pemanas listrik;
- Labu ukur 1 000 ml, 500 ml, 100 ml, dan 50 ml terkalibrasi;
- Gelas piala steril;
- Erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet volumetrik steril 10,0 ml dan 1,0 ml terkalibrasi, dilengkapi dengan *bulb* dan *pipettor*;
- Tabung reaksi; dan
- Sendok, gunting, dan spatula steril.

A.9.1.3 Larutan Pengencer

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);

- KH_2PO_4 34 g
- Air suling 500 ml

Atur pH dengan NaOH sehingga mencapai pH 7,2, tepatkan volume sampai 1 000 ml dengan air suling. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, simpan pada refrigerator. Untuk membuat larutan pengencer 1,25 ml larutan stok diencerkan dengan air suling sampai volume 1 000 ml. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol pengencer sebanyak 450 ml dan tabung reaksi sebanyak 9 ml, kemudian disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.9.1.4 Homogenisasi contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 ml larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1 : 10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.9.2 Angka lempeng total

A.9.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 48 jam pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

A.9.2.2 Peralatan

- Inkubator $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$, terkalibrasi;
- Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- Otoklaf;
- Penangas air bersirkulasi $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- Alat penghitung koloni;
- Tally register*;
- Botol pengencer 160 ml terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- Pipet ukur 1 ml steril dengan skala 0,1 ml dilengkapi *bulb* dan *pipettor*; dan
- Cawan Petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril.

A.9.2.3 Pembenihan dan pengencer

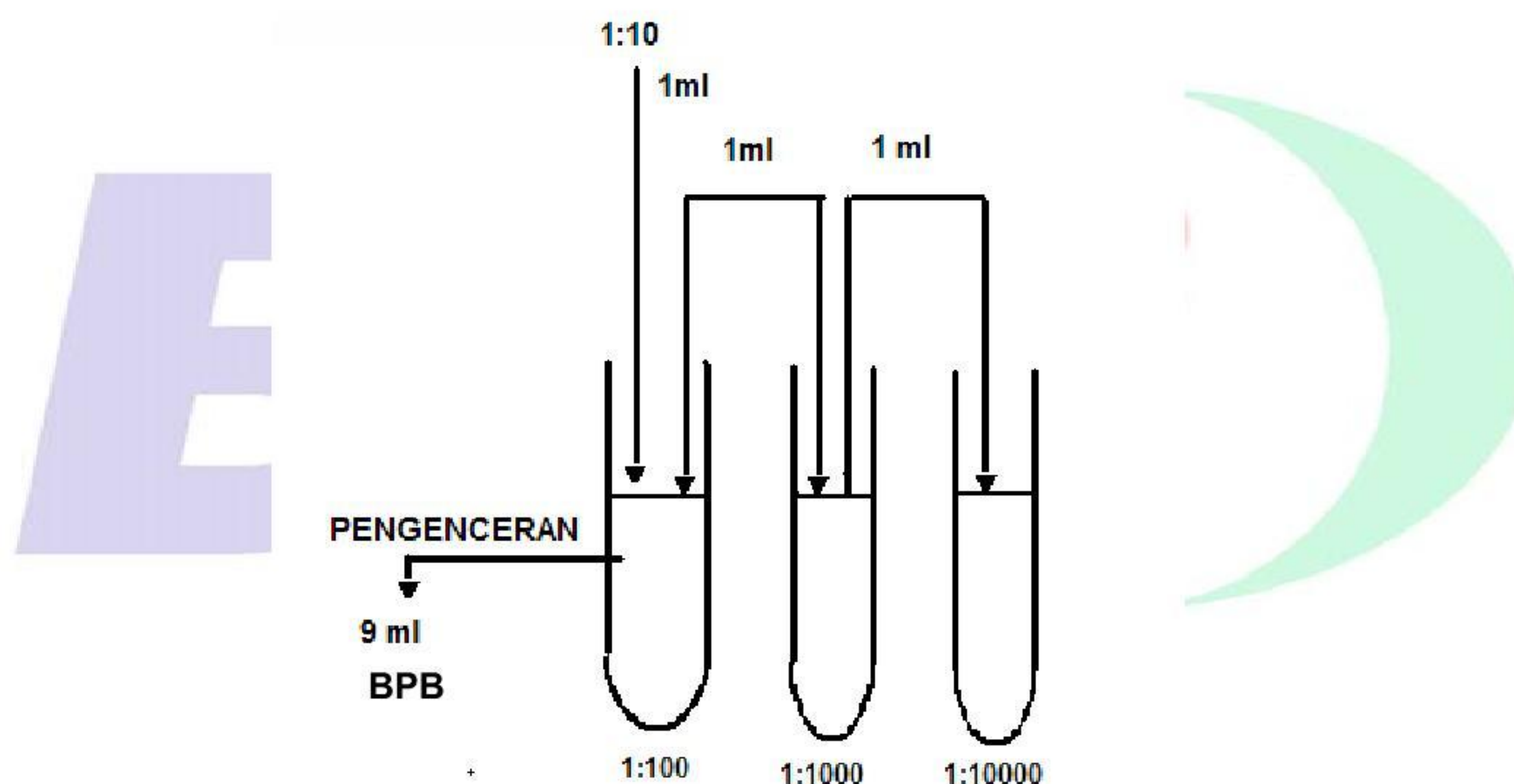
Plate count agar (PCA)

– Tryptone	5 g
– Yeast extract	2,5 g
– Glukosa	1 g
– Agar	15 g
– Air suling	1 000 ml

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 ml dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.9.2.4 Cara kerja

- Buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti pada Gambar A.1 dengan menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water* (BPB);
- pipet masing-masing 1 ml dari tingkat pengenceran (F) 10^{-1} sampai dengan 10^{-4} ke dalam cawan Petri steril secara duplo;



Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate Buffered Dilution Water* (BPB).

- tuangkan 12 ml sampai dengan 15 ml media PCA yang masih cair dengan suhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ke dalam masing-masing cawan Petri;
- goyangkan cawan Petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat;
- kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
- biarkan sampai campuran dalam cawan Petri memadat;
- masukkan semua cawan Petri dengan posisi terbalik ke dalam inkubator pada suhu $35 ^\circ\text{C}$ selama (48 ± 2) jam; dan
- catat pertumbuhan koloni (n) pada setiap cawan Petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni setelah 48 jam.

A.9.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/g) = $n \times F$

Keterangan:

- n adalah rata – rata koloni dari dua cawan Petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);
 F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai

A.9.2.6 Pernyataan hasil

A.9.2.6.1 Cara menghitung

- Pilih cawan Petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan Petri. Hitung semua koloni dalam cawan Petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- jika salah satu dari dua cawan Petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan:

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap Petri;
 n_1 adalah jumlah Petri dari pengenceran pertama yang dihitung;
 n_2 adalah jumlah Petri dari pengenceran kedua;
 d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- jika jumlah koloni dari masing-masing Petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;

- jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640\,000 (6.4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya: area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000 (6.5 \times 10^6)$
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000 (5.9 \times 10^6)$

- jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan Petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
- menghitung koloni yang merambat.
Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :
 - perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;
 - perambatan yang terjadi diantara dasar cawan Petri dan pembenihan; dan
 - perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.
 Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu perambatan dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.

A.9.2.6.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri):

- Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut:
 - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap.
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.9.3 *Escherichia coli*

A.9.3.1 Prinsip

Pertumbuhan *Escherichia coli* (*E. coli*) ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung Durham, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

A.9.3.2 Peralatan

- Lemari pengering (inkubator), $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, $(45,5 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$;
- rak untuk tabung reaksi;
- pipet Mohr 1 ml dan 10 ml berskala;

- e) botol pengenceran (± 20 ml) gelas borosilikat yang resistan, dengan sumbat karet atau tutup uliran;
- f) tabung reaksi;
- g) tabung Durham;
- h) cawan Petri gelas ukuran 15 mm x 100 mm atau plastik ukuran 15 mm x 90 mm, steril; dan
- i) jarum ose (inokulasi), dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

A.9.3.3 Perbenihan pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose* (LST) broth / *Lauryl tryptose* (LT) broth;
- b) *brilliant green lactose bile* (BGLB) broth 2 %;
- c) *Escherichia coli* (EC) broth;
- d) *Levine's eosin methylene blue* (L-EMB) agar;
- e) *plate count agar* (PCA);
- f) *gram stain*;
- g) *tryptone (tryptophane) broth*;
- h) pereaksi kovacs';
- i) *Methyl red – voges proskauer* (MR – VP) broth;
- j) pereaksi voges proskauer;
- k) larutan *methyl red*;
- l) *koser's citrate broth*;
- m) *peptone diluents* 0.1 %;
- n) pereaksi *indole*;
- o) larutan kalium hidroksida 40 %;
- p) *buffer fields phosfat buffered dilution water*;
- q) larutan *alpha naphthol* 5 %; dan
- r) kristal kreatin.

A.9.3.4 Cara kerja

A.9.3.4.1 APM – Uji pendugaan untuk *E. coli*

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada A.9.1,
- b) inokulasikan masing-masing 1 ml larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *Lauryl sulfate tryptose* (LST) broth. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya,
- c) masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35°C selama (48 ± 2) jam,
- d) amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke - (24 ± 2) . Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif",
- e) tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam,
- f) catat adanya pembentukan gas setelah inkubasi (48 ± 2) jam, dan nyatakan tabung tersebut "positif", dan
- g) lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif untuk uji pendugaan.

A.9.3.4.2 APM – Uji penegasan untuk *E. coli*

- a) Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung EC broth yang berlainan,
- b) inkubasikan tabung-tabung EC tersebut ke dalam penangas air yang bersirkulasi, selama (24 ± 2) jam pada suhu $(45,5 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$, tabung yang telah terbentuk gas dinyatakan "positif",

- c) apabila negatif, inkubasikan dan periksa kembali pada jam ke-(48 ± 2). Jika telah terbentuk gas maka tabung tersebut dinyatakan "positif", dan
- d) lakukan uji lengkap terhadap semua tabung yang positif untuk uji penegasan.

A.9.3.4.3 Uji lengkap untuk *E. coli*

- a) Kocok tabung-tabung EC yang positif secara hati-hati,
- b) digoreskan/ditanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimum 0,5 cm,
- c) inkubasikan pinggan L-EMB tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu (35 ± 1) °C,
- d) periksa cawan-cawan terhadap adanya koloni yang berwarna hijau dengan atau tanpa kilat logam,
- e) dari tiap cawan L-EMB, pindahkan maksimal 5 koloni yang mencurigakan pada tabung agar miring PCA,
- f) inkubasikan tabung-tabung agar miring tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu 35 °C dan gunakan untuk uji selanjutnya,
- g) buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan. *E. coli* adalah gram negatif dan berbentuk batang tak berspora yang harus diuji menggunakan reaksi-reaksi IMVIC seperti di bawah ini serta harus diinokulasikan kembali ke tabung LST untuk menegaskan adanya produksi gas,
 - pembentukan indol
 - Inokulasi tabung *tryptone broth*,
 - inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C,
 - uji adanya indol dengan menambahkan 0,2 ml sampai dengan 0,3 ml pereaksi Kovacs', dan
 - uji ini positif bila lapisan atas berwarna merah.
 - uji *Voges Proskauer*
 - Inokulasi tabung medium MR-VP dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama (48±2) jam pada suhu 35 °C,
 - secara aseptis pindahkan 1 ml biakan tabung reaksi steril,
 - tambahkan 0,6 ml larutan 5 % *alpha naphthol* dalam alkohol, 0,2 ml larutan KOH 40 % dan beberapa butir kristal kreatin, dan
 - uji *Voges Proskauer* adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
 - uji *Methyl red*
 - Setelah uji VP, inkubasikan kembali tabung MR-VP selama 48 jam pada suhu 35 °C;
 - tambahkan 5 tetes indikator *methyl red* pada setiap tabung, dan
 - biakan dianggap MR positif bila terjadi warna merah, MR negatif bila kuning.
 - penggunaan Sitrat
 - Dengan hati-hati tabung *Koser's citrate broth* diinokulasi dengan menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan medium. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat-zat lain,
 - inkubasikan selama 96 jam pada suhu 35 °C, dan
 - adanya pertumbuhan dalam tabung yang ditunjukkan dengan warna keruh menandakan uji yang positif.
 - pembentukan gas dari *Lactose*
 - Inokulasikan tabung LST dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C, dan
 - periksa tabung tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

A.9.3.4.4 Klasifikasi dan laporan

Tabel A.1 - Reaksi biokimia *E. coli* pada uji IMVIC

Jasad	Indol	Methyl Red	Voges Proskauer	Sitrat
<i>E. coli</i>				
Varitas I	+	+	-	-
Varitas II	-	+	-	-

- Klasifikasikan sebagai *E. coli* apabila IMVIC adalah ++-- atau --++, pewarnaan gram menunjukkan gram negatif bentuk batang tidak berspora yang membentuk gas dalam kaldu LST dengan waktu inkubasi (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C
- Hitunglah APM *E. coli* dengan menggunakan Tabel A.2 APM berdasarkan jumlah tabung - tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *E. coli*.

Tabel A.2 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1; 0,01; dan 0,001 g/ ml contoh

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	>1100

A.9.4 *Salmonella* sp.

A.9.4.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan ditegaskan melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella* sp.

A.9.4.2 Peralatan

- a) Inkubator (35 ± 2) °C;
- b) Inkubator *refrigerated* atau *laboratory refrigerator* (4 ± 2) °C;
- c) Otoklaf;
- d) Oven;
- e) Neraca, kapasitas 2 000 g, dengan ketelitian 0,1 g;
- f) Neraca, kapasitas 120 g, dengan ketelitian 5 mg;
- g) Penangas air, (49 ± 1) °C;
- h) Penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*, ($42 \pm 0,2$) °C;
- i) pH meter;
- j) Blender dan blender jar (botol) steril;
- k) Botol bertutup ulir bermulut lebar (500 ml) steril, *Erlenmeyer* 500 ml steril, *beaker*, 250 ml steril, *sterile glass* atau *paper funnels* dengan ukuran sesuai, dan, pilihan lain, kontainer dengan kapasitas sesuai untuk mengakomodasi contoh komposit;
- l) *Bent glass* atau batang penyebar plastik steril;
- m) Sendok steril, atau peralatan lain untuk memindahkan contoh makanan;
- n) Cawan Petri steril, 15 x 100 mm, kaca atau plastik;
- o) Pipet steril, 1 ml dengan ketelitian 0,01 ml; dan pipet steril 5 dan 10 ml dengan skala 0,1 ml;
- p) Jarum Ose (diameter ± 3 mm), terbuat dari *nichrome*, *platinum-iridium chromel wire* atau plastik steril;
- q) Jarum Ose yang berujung runcing;
- r) Tabung reaksi atau tabung biakan steril, 16 x 150 mm dan 20 x 150 mm; tabung serologikal, 10 x 75 mm atau 13 x 100 mm;
- s) Botol pengencer 500 ml;
- t) Rak tabung reaksi atau rak tabung biakan;
- u) *Vortex mixer*;
- v) Lampu (untuk mengamati reaksi serologi);
- w) *Fisher* atau *Bunsen burner*;
- x) Kertas pH (kisaran pH 6 - 8) dengan ketelitian maksimal 0,4 unit pH per perubahan warna; dan
- y) Gunting, gunting besar, pisau bedah, dan *forceps* steril.

A.9.4.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *Lactose Broth* (LB);
- b) *Tetrathionate* (TT) *broth*;
- c) Media *Rappaport-Vassiliadis* (RV) (media RV harus dibuat dari bahan-bahan yang terdapat dalam komposisi media RV tersebut. Formulasi yang tersedia secara komersial tidak dapat diterima);
- d) Agar *Xylose lysine desoxycholate* (XLD) (agar XLD);
- e) Agar *Hektoen enteric* (HE);
- f) Agar *Bismuth sulfite* (BS);
- g) Agar *Triple sugar iron* (TSI);

- h) *Tryptone* (atau *tryptophane*) *broth* (TB);
- i) *Trypticase soy-tryptose broth* (TSTB);
- j) *Methyl red-Voges Proskeaur* (MR-VP) *broth*
- k) *Agar Simmons citrate*;
- l) *Urea broth*;
- m) *Rapid urea broth*;
- n) *Malonate broth*;
- o) *Lysine iron agar* (LIA) (Edward dan Fife)
- p) *Lysine decarboxylase broth* (LDB);
- q) *Potassium cyanide* (KCN) *broth*;
- r) *Phenol red carbohydrate broth* (*Phenol red lactose broth* dan *Phenol red red sucrose broth*) atau *Purple carbohydrate broth* (*Purple lactose broth* dan *Purple sucrose broth*);
- s) *Phenol red dulcitol* atau *Purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*;
- t) *Agar MacConkey*;
- u) *Brain heart infusion* (BHI) *broth*;
- v) *Tryptose blood agar base*;
- w) Pereaksi Kovacs';
- x) Pereaksi uji Voges-Proskauer (VP);
- y) Kristal kreatin fosfat;
- z) Larutan potasium hidroksida (KOH), 40 %;
- aa) Larutan *bromocresol purple dye*, 0,2 %;
- bb) Indikator merah metil;
- cc) Indikator *phenol red* atau *bromocresol purple*;
- dd) Air suling steril;
- ee) Larutan *physiological saline*, 0,85 % (steril);
- ff) Larutan *formanilized physiological saline*;
- gg) *Formanilized antigen*;
- hh) Alfa naftol;
- ii) *Salmonella polyvalent somatic* (O) *antiserum*;
- gg) *Salmonella polyvalent flagellar* (H) *antiserum*;
- kk) *Salmonella polyvalent somatic* (O) *antiserum*; dan
- ll) *Salmonella somatic group* (O) *antisera*: A, B, C₁, C₂, C₃, D₁, D₂, E₁, E₂, E₃, E₄, F, G, H, I, Vi, atau kelompok lain yang sesuai.

A.9.4.4 Cara Kerja

A.9.4.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Timbang 25 g contoh ke dalam blender yang steril dan tambahkan 225 ml LB steril. Kocok selama 2 menit;
- b) pindahkan secara aseptik ke dalam botol pengencer 500 ml dan biarkan pada suhu ruang selama (60 ± 5) menit dengan wadah tertutup. Kocok perlahan dan atur pH sampai (6,8 ± 0,2);
- c) tambahkan 0,45 ml larutan *briliant green dye* 1 %, kocok hingga tercampur merata; dan
- d) kendurkan tutup wadah secukupnya/ ¼ putaran. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada 35 °C.

A.9.4.4.2 Pengkayaan

- a) Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi;
- b) pipet 0,1 ml biakan pra-pengkayaan kedalam 10 ml media RV dan 1 ml biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 ml TT *broth* dan vorteks masing-masing campuran tersebut; dan

- c) inkubasikan media RV pada suhu $(42 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 2) jam dalam penangas air bersirkulasi dan TT *broth* pada $(35 \pm 2,0) ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 2) jam.

A.9.4.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- a) Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum Ose diameter 3 mm, goreskan biakan pengkayaan TT *broth* ke dalam cawan Petri yang berisi media agar XLD, HE dan BS. Siapkan agar BS sehari sebelum digunakan dan simpan di tempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores.
- b) ulangi cara di atas dari media agar pengkayaan RV;
- c) inkubasikan cawan-cawan media agar BS, HE dan XLD selama (24 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$;
- d) amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella* sp., setelah inkubasi (24 ± 2) jam. Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* sp. dari masing-masing media agar selektif setelah inkubasi (24 ± 2) jam. Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:
- XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam;
- HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.
- BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.
- e) jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi (24 ± 2) jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama (24 ± 2) jam. Jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi (48 ± 2) jam, ambil 2 atau lebih koloni tersebut;
- f) dengan menggunakan jarum Ose berujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan kedalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena reaksi *Lysine decarboxylase* sangat anaerobik, agar miring LIA harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu $(5 - 8) ^\circ\text{C}$;
- g) inkubasi agar miring TSI dan LIA pada suhu $35 ^\circ\text{C}$ selama (24 ± 2) jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya H_2S yang berlebihan. Pada TSI, biakan *Salmonella* sp. akan menghasilkan alkalin (merah) pada media agar miring dan asam (kuning) pada tusukan agar tegak, dengan atau tanpa memproduksi H_2S (warna kehitaman pada agar). Pada LIA biakan *Salmonella* sp. Akan menghasilkan reaksi alkalin (ungu) pada tusukan pada tabung agar tegak. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai negatif. Jangan hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan negatif. Umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk H_2S pada agar miring LIA. Beberapa biakan non *Salmonella* sp. membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA;
- h) semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan didalam media LIA tanpa memperhatikan reaksi TSI akan dianggap sebagai *Salmonella* sp. dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Biakan yang menghasilkan asam pada tusukan media agar tegak LIA dan alkalin pada agar miring serta reaksi asam pada tusukan pada media agar tegak TSI harus dipertimbangkan juga sebagai potensial *Salmonella* sp. dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Biakan yang memberikan reaksi asam pada tusukan di media agar tegak LIA dan asam pada agar miring TSI, serta reaksi asam pada tusukannya di media agar tegak TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp. Bila biakan TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella* sp. (alkalin pada bagian miring dan

asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang diduga dari media selektif yang tidak memberikan biakan duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA seperti cara mulai pasal f di atas; dan

- i) lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap:
 - tiga biakan presumtif TSI dari 1 set media agar selektif (HE, XLD dan BS) yang diinokulasi dari TTB, dan tiga biakan presumtif yang diinokulasikan dari RV; dan
 - jika tiga biakan presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media agar selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 biakan TSI untuk setiap 25 g contoh makanan.

A.9.4.5 Identifikasi *Salmonella* sp.

A.9.4.5.1 Biakan campuran

- a) Apabila biakan agar TSI terlihat tercampur, maka goreskan kembali ke dalam media agar *MacConkey*, HE atau XLD broth. Inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C . Amati koloni yang diduga *Salmonella* sp., yaitu :
 - agar *Mac Conkey*. Koloni tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella* sp. akan membentuk area yang terang pengendapan *bile* disebabkan oleh bakteri lain yang muncul atau tumbuh;
 - agar *hektoen enteric* (HE). Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam; dan
 - agar *xylose lysine desoxycholate* (XLD). Koloni merah muda dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- b) pindahkan sedikitnya 2 koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media TSI dan LIA sesuai dengan A.9.4.4.3.f dan lanjutkan sesuai dengan A.9.4.4.3.g.

A.9.4.5.2 Biakan murni

- a) Uji urease (konvensional); dan
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* sp. dari media agar miring TSI dengan jarum Ose ke dalam tabung *urea broth*. Karena kadang-kadang tabung *urea broth* yang tidak diinokulasikan biakan akan berubah warna menjadi merah keunguan (uji positif) maka perlu dibuat tabung *urea broth* tanpa inokulasi sebagai kontrol. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C ; dan
- b) Uji urease (cepat).
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* sp. dari media agar miring TSI dengan jarum Ose berdiameter 3 mm ke dalam tabung *rapid urea Broth*. Inkubasikan 2 jam dalam penangas air pada suhu $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. Biarkan *Salmonella* sp. akan memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna) pada uji urease, walaupun demikian perlu uji lebih lanjut.

A.9.4.5.3 Pengujian biakan urease negatif

- a) *Lysine decarboxylase* (LD) broth;
Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 Ose koloni yang diduga *Salmonella* sp. dari agar miring TSI dan inokulasikan ke dalam media LDA. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella* sp. memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu tambahkan beberapa tetes 0,2 % *bromocresol purple dye* dan amati perubahan warnanya.

- b) *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*; dan inokulasi media *dulcitol broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C, tetapi amati setelah inkubasi 24 jam. Pada umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil positif yang ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung *Durham* dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *Durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.
- c) *Tryptone (tryptophane) broth* (TB);
Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 35 °C dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini:
- *Potassium cyanide* (KCN) *broth*
Pindahkan 1 ose biakan dari TB 24 jam ke dalam media KCN *broth*. Tutup tabung rapat-rapat dan bila perlu dilapisi dengan parafin atau film. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan (ditandai dengan adanya kekeruhan). Umumnya *Salmonella* sp. tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai dengan tidak terjadinya kekeruhan.
 - *Malonate broth*
Pindahkan 1 mata ose dari biakan TB ke dalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C, tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang tabung *malonate broth* yang tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada *broth* ini.
 - Uji indol
Dari media TB yang tersisa pindahkan 5 ml biakan ke dalam tabung reaksi steril, tambahkan 0,2 ml sampai dengan 0,3 ml pereaksi Kovacs'. Amati segera setelah penambahan pereaksi. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai positif.
Nyatakan biakan sebagai bukan *Salmonella* sp. bila reaksi indol positif dan *flagellar* (H) negatif, atau KCN positif dan LDB negatif;

A.9.4.5.4 Uji serologi *polyvalent flagellar* (H)

- a) Inokulasi dari masing-masing agar TSI yang memberikan reaksi urease negatif ke dalam:
- *BHI broth*, dan inkubasi selama 4 jam sampai dengan 6 jam pada suhu 35 °C sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama); atau
 - *Trypticase soy tryptose* (TST) *broth* dan inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C (untuk diuji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 ml larutan *formanilized physiological saline* ke dalam 5 ml biakan di atas.
- b) siapkan 2 biakan dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi *formanilized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera. Masukkan $\pm 0,5$ ml larutan *saline Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera dalam tabung serologi 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,5 ml antigen yang akan diuji. Siapkan kontrol *saline* dengan mencampur 0,5 ml *formanilized physiological saline* dengan 0,5 ml *formanilized* antigen. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48 °C sampai dengan 50 °C. Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam, sebagai berikut:
- Positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol;
 - negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan dalam kontrol; dan
 - non spesifik terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan kontrol.

A.9.4.5.5 Uji serologi *polyvalent somatic* (o)

- Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 jam sampai dengan 48 jam dengan 2 ml 0,85 % *saline* menggunakan jarum Ose (dapat juga menggunakan biakan dari *tryptose blood agar base* tanpa darah);
- tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes *polyvalent somatic* (o) antiserum ke dalam bagian yang lain;
- campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- klasifikasi uji *polyvalent somatic* (o) menunjukkan hasil sebagai berikut:
 - Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;
 - negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan
 - non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

A.9.4.5.6 Uji biokimia tambahan

Nyatakan sebagai *Salmonella* sp., biakan yang memberikan reaksi yang khas sesuai dengan Tabel A.3 butir 1-11. Jika 1 biakan TSI dari setiap 25 g contoh menunjukkan *Salmonella* sp., uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Biakan yang memberikan reaksi positif pada uji serologi *flagellar* (H) tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella* sp. pada uji biokimia, harus dimurnikan sesuai dengan A.9.4.5.1 diatas dan uji kembali, sesuai dengan A.9.4.5.2 Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap biakan yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti Tabel A.3 :

- Phenol red lactose* atau *purple lactose broth*;
 - inokulasi *broth* ini dengan biakan agar TSI miring yang telah diinkubasi selama 24 jam sampai 48 jam. Inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C, tetapi amati setelah 24 jam;
 - nyatakan positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung *Durham*. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *Durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media;
 - jika biakan memberikan reaksi *lactose* positif, maka nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp., kecuali biakan yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*.
- Phenol red sucrose* atau *purple sucrose broth*;
Ikuti prosedur sesuai dengan A.9.4.5.6.a. Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp. pada biakan yang memberikan reaksi positif uji sukrosa, kecuali biakan yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA;
- Methyl red-Voges-Proskauer* (MR-VP) *broth*; dan
Inokulasi media dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
Lakukan uji *Voges-Proskauer* (VP) pada suhu ruang sebagai berikut :
 - Pindahkan 1 ml MR-VP *broth* yang telah diinkubasi selama (48 ± 2) jam ke dalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
 - Tambahkan 0,6 ml alfa naftol dan aduk;

- Tambahkan 0,2 ml larutan KOH 40 % dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam; dan
- Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi VP negatif.

Uji merah metil (MR)

- Tambahkan 5 tetes sampai dengan 6 tetes indikator merah metil ke dalam 5 ml media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam;
- amati hasilnya dengan segera; dan
- umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukkan reaksi negatif.

Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp. biakan yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif.

d) Agar *Simmons citrate*.

- Inokulasi media dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari agar miring TSI, dengan cara menggores agar miring dan menusuk bagian tegak. Inkubasikan selama (96 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
- nyatakan positif apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil sitrat positif; dan
- negatif apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

A.9.4.5.7 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella* sp. biakan-biakan yang mempunyai reaksi seperti pada Tabel A.3. Laporkan sebagai bukan *Salmonella* sp. biakan-biakan yang memberikan reaksi seperti pada Tabel A.4. Bila tidak ada 1 biakan TSI yang menunjukkan reaksi *Salmonella* sp. pada uji biokimia, lakukan uji biokimia sesuai dengan A.9.4.5.3 terhadap biakan yang memberikan reaksi urease negatif dari contoh yang sama.

Tabel A.3 - Reaksi biokimia dan serologi untuk *Salmonella* sp.

No.	Substrat uji	Hasil reaksi		<i>Salmonella</i> sp. reaksi species ^a
		Positif	Negatif	
1.	<i>Glucose</i> (TSI)	tusukan kuning	tusukan merah	+
2.	<i>Lysine decarboxylase</i> (LIA)	tusukan ungu	tusukan kuning	+
3.	H ₂ S (TSI dan LIA)	Hitam	tidak hitam	+
4.	<i>Urease</i>	warna ungu sampai merah	tidak ada perubahan warna	-
5.	<i>Lysine decarboxy broth</i>	warna ungu	warna kuning	+
6.	<i>Phenol red dulcitol broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tanpa/ tidak berbentuk gas, tidak berubah warna	+ ^b
7.	KCN <i>broth</i>	pertumbuhan	tidak ada pertumbuhan	-
8.	<i>Malonate broth</i>	warna biru	tidak berubah warna	- ^c
9.	Uji <i>indol</i>	permukaan bewarna violet	permukaan bewarna kuning	-
10.	Uji <i>polyvalent flagellar</i>	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
11.	Uji <i>polyvalent somatic</i>	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
12.	<i>Phenol red lactose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	- ^c
13.	<i>Phenol red sucrose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14.	Uji <i>Voges-Proskauer</i>	merah muda sampai merah	tidak berubah warna	-
15.	Uji <i>methyl red</i>	merah menyebar	Kuning menyebar	+
16.	<i>Simmons citrate</i>	pertumbuhan, warna biru	tidak ada pertumbuhan dan perubahan warna	V

Keterangan:
^a+ adalah 90 % atau lebih positif dalam satu atau dua hari;
 - adalah 90 % atau lebih negatif dalam satu atau dua hari;
 V adalah variabel;
^b adalah mayoritas dari biakan *Salmonella arizonae*: negatif; dan
^c adalah mayoritas dari biakan *Salmonella arizonae*: positif.

Tabel A.4 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non *Salmonella* sp.

No	Substrat uji	Hasil
1	<i>Urease</i>	positif (warna ungu-merah)
2	Uji <i>indol</i> dan <i>polivalent flagellar</i> (H) atau uji <i>indol</i> dan uji Spicer Edwards <i>flagellar</i>	positif (permukaan warna violet) negatif (tidak ada penggumpalan) positif (permukaan warna violet) negatif (tidak ada penggumpalan)
3	<i>Lysine decarboxylase</i> dan KCN <i>broth</i>	positif (ada pertumbuhan) negatif (warna kuning)
4	<i>Phenol red lactose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^{a,b}

Tabel A.4 (lanjutan)

No	Substrat uji	Hasil
5	<i>Phenol red sucrose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^b
6	KCN broth, uji <i>Voges-Proskauer</i> , dan <i>methyl red</i>	positif (ada pertumbuhan) positif (warna merah muda sampai merah) negatif (warna kuning menyebar)
Keterangan: ^a adalah uji <i>malonate broth</i> lebih lanjut pada biakan yang positif untuk menentukan <i>Salmonella arizonae</i> ^b adalah jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan <i>Salmonella</i> sp., uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut <i>Salmonella</i> sp..		

A.9.5 *Staphylococcus aureus*

A.9.5.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) pada pembenihan khusus setelah diinkubasi pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam dan dilanjutkan dengan uji koagulasi.

A.9.5.2 Peralatan

- Inkubator (35 ± 1) °C, terkalibrasi;
- Oven/alat sterilisasi kering, terkalibrasi;
- Spreader* steril dari gelas;
- Botol pengencer 500 ml;
- Pipet ukur 10 ml dan 1 ml;
- Tabung reaksi;
- Cawan Petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril; dan
- Jarum Ose.

A.9.5.3 Pembenihan dan pereaksi

- Baird-parker agar* (BPA);
- Brain heart infusion broth* (BHIB); dan
- Plasma koagulase (dari kelinci).

A.9.5.4 Cara kerja

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.9.1;
- pipet 1 ml larutan contoh ke dalam 3 cawan Petri berisi media BPA (misalkan 1 ml dibagi menjadi 0,3 ml; 0,3 ml; dan 0,4 ml larutan contoh);
- sebar contoh secara merata dengan menggunakan *spreader* steril. Tahan cawan dalam posisi tegak lurus sampai contoh diserap oleh media (± 10 menit). Jika contoh tidak mudah terserap oleh media, tempatkan cawan Petri pada posisi tegak lurus di dalam inkubator selama 1 jam sebelum cawan Petri dibalik;
- inkubasikan pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam; dan
- pilih cawan Petri yang mengandung 20 koloni sampai dengan 200 koloni dan hitung koloni yang diduga sebagai *S. aureus*, yaitu koloni berwarna abu-abu sampai hitam mengkilat dengan lingkaran cerah disekelilingnya dan seringkali lingkaran jernih, koloni mempunyai getah kental ketika disentuh dengan jarum Ose.

A.9.5.5 Uji koagulasi

- Pindahkan 5 koloni sampai dengan 10 koloni yang diduga sebagai *S. aureus* ke dalam tabung berisi 0,2 ml sampai dengan 0,3 ml BHIB;
- inkubasikan pada suhu 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam;
- tambahkan plasma koagulase kelinci sebanyak 0,5 ml ke dalam biakan BHIB dan campur;
- inkubasikan campuran plasma koagulase kelinci dengan biakan BHIB pada 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam, kemudian amati terbentuknya penggumpalan setiap 6 jam. *S. aureus* positif apabila terbentuk gumpalan yang kokoh dan utuh serta dapat bertahan dalam tabung ketika dibalikkan;
- amati ada tidaknya koagulasi. Bila tidak terjadi koagulasi, lanjutkan inkubasi pada suhu kamar selama 24 jam, dan amati kembali ada tidaknya koagulasi;
- ratakan koloni (n) dari ketiga cawan Petri yang diwakili oleh koloni yang memberikan reaksi penggumpalan dan dikalikan dengan faktor pengenceranya (F); dan
- hitung jumlah *S. aureus* dalam 1 g contoh.

A.9.5.6 Perhitungan

$$S. aureus \text{ (koloni/25 g)} = n \times F \times 25$$

Keterangan:

n adalah jumlah koloni, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g); dan
F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.9.6 *Bacillus cereus*

A.9.6.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* (*B. cereus*) ditandai dengan terbentuknya koloni eosin merah muda penghasil *lechitinase*, yang diikuti dengan uji penegasan pada berbagai media.

A.9.6.2 Peralatan

- Inkubator (30 ± 2) °C dan (35 ± 2) °C, terkalibrasi;
- Alat homogenisasi yang sesuai dengan kecepatan putaran 18 000 rpm sampai dengan 21 000 rpm;
- Penangas air, (48 – 50) °C;
- Mikroskop, *microscop slide* dan *cover slip*;
- Alat penghitung koloni;
- Vorteks mixer*;
- Bunsen* burner besar dan kecil;
- Rak tabung biakan;
- Botol, steril;
- Tabung anaerobik *GasPak* dilengkapi dengan H₂ + CO₂ *generator envelopes* dan katalisnya;
- Tabung biakan, (ukuran 13 mm x 100 mm), steril;
- Pipet ukur 10 ml, 5 ml dan 1 ml berskala 0,1 ml steril;
- Cawan Petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril;
- Batang penyebar steril, diameter 3 mm sampai dengan 4 mm dengan area penyebar 45 mm sampai dengan 55 mm;
- Jarum Ose, berukuran 2 mm dan 3 mm; dan
- Pena penanda.

A.9.6.3 Media dan pereaksi

- a) Agar Mannitol-egg yolk-polymyxin (MYP);
- b) Egg yolk emulsion, 50 %;
- c) Trypticase soy-polymyxin broth;
- d) Larutan polimiksin B untuk MYP agar (0,1 %) dan trypticase soy-polymyxin broth (0,15 %);
- e) Lisozim 0,001 %;
- f) Phenol red glucose broth;
- g) Agar tirosin;
- h) Lysozyme broth;
- i) Media Voges-Proskauer;
- j) Nutrient broth;
- k) Nitrate broth;
- l) Nutrient agar (NA) untuk *B. cereus*;
- m) Pereaksi sulfanilic acid;
- n) Pereaksi alfa naftol;
- o) Butterfield's phosphate-buffered dilution water (BPB) yang disterilkan dalam botol dengan volume akhir (450 ± 5) ml dan (90 ± 2) ml;
- p) Pereaksi uji Voges-Proskauer;
- q) Larutan kalsium hidroksida, KOH 40 %;
- r) Kristal kreatin; dan
- s) Metanol.

A.9.6.4 Persiapan contoh

- a) timbang 50 g contoh ke dalam blender yang bersih dan steril secara aseptik,. Tambahkan 450 ml butterfield's phosphate-buffered dilution water (1 : 10) dan kocok selama 2 menit pada kecepatan tinggi (18 000 rpm sampai dengan 21 000 rpm); dan
- b) buat seri pengenceran dengan menggunakan larutan BPB (1 : 10).

A.9.6.5 Penetapan *B. cereus***A.9.6.5.1 APM - *B. cereus***

- a) Teknik APM direkomendasikan untuk menghitung *B.cereus* dalam contoh yang diharapkan mengandung *B. cereus* lebih kecil dari 10 per gram contoh;
- b) inokulasikan masing-masing 1 ml larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung trypticase soy-polymyxin broth;
- c) inkubasikan tabung-tabung tersebut dalam inkubator pada suhu 30 °C selama (48 ± 2) jam;
- d) amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- (48 ± 2) untuk melihat pertumbuhan bakteri *B. cereus*;
- e) gores biakan dari tabung yang positif dengan Ose ke dalam media agar MYP dan inkubasi selama 24 jam sampai dengan 48 jam pada suhu 30 °C;
- f) ambil 1 atau lebih koloni yang berwarna eosin merah muda dengan lechitinase positif dari media agar MYP dan pindahkan ke media miring NA untuk uji penegasan *B.cereus* sesuai dengan A.9.6.6; dan
- g) hitunglah APM *B. cereus* dengan menggunakan Tabel A.2 APM berdasarkan jumlah tabung-tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *B. cereus*.

A.9.6.5.2 Angka Lempeng Total - *B. cereus*

- Buat tingkat pengenceran dari 10^{-2} sampai dengan 10^{-6} dengan memindahkan 10 ml contoh yang telah dihomogenkan ke dalam 90 ml larutan pengencer, aduk dengan kuat dan lanjutkan ke pengenceran 10^{-6} ;
- inokulasi sebanyak 0,1 ml masing-masing tingkat pengenceran (termasuk 1 : 10) menggunakan batang penyebar steril di atas permukaan media agar MYP, lakukan secara duplo;
- inkubasi media agar MYP pada suhu 30 °C selama 24 jam;
- amati koloni yang dikelilingi oleh zona endapan yang menunjukkan bahwa *B. cereus* menghasilkan *lecithinase* berwarna merah muda. Warnanya akan menjadi lebih jelas apabila inkubasi dilanjutkan;
- jika warna merah muda tidak jelas, lanjutkan inkubasi selama 24 jam lagi sebelum perhitungan koloni;
- pilih media yang mengandung 15 koloni sampai dengan 150 koloni eosin merah muda penghasil *lecithinase*;
- beri tanda di bagian dasar cawan Petri berdasarkan zona yang terbentuk menggunakan pena penanda untuk memudahkan perhitungan dan penjumlahan koloni *B. cereus*;
- ambil 5 atau lebih koloni yang positif mengandung *B. cereus* dari media agar MYP dan pindahkan ke media miring NA untuk uji penegasan *B. cereus* sesuai dengan A.9.6.6; dan
- hitung jumlah *B. cereus* per gram contoh berdasarkan persentase koloni yang telah diuji dan ditegaskan sebagai *B. cereus*.

$$B. \text{ cereus (koloni/g)} = n \times \frac{a}{b} \times F \times 10$$

Keterangan:

- n adalah rata-rata koloni dari dua cawan Petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);
 a adalah jumlah koloni yang sudah ditegaskan sebagai *B. cereus*;
 b adalah jumlah koloni yang diambil dari koloni yang positif *B. cereus*;
 F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai;
 10 adalah faktor pengenceran dari jumlah contoh yang diinokulasi (0,1 ml).

Contoh perhitungan:

Jika jumlah rata-rata yang diperoleh pada pengenceran 10^{-3} adalah 65 dan 4 dari 5 koloni telah diuji dan dinyatakan sebagai *B. cereus* maka jumlah sel *B. cereus* per gram contoh adalah :

$$B. \text{ cereus (koloni/g)} = 65 \times \frac{4}{5} \times 1.000 \times 10$$

$$B. \text{ cereus (koloni/g)} = 520.000$$

A.9.6.6 Uji penegasan untuk *B. cereus*

A.9.6.6.1 Biakan campuran

- Ambil 5 atau lebih koloni yang berwarna eosin merah muda dengan *lechitinase* positif dari media agar MYP dan pindahkan ke media miring NA untuk uji penegasan *B. cereus*;
- inkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C;
- lakukan pengamatan secara mikroskopis, disertai pewarnaan gram. *B. cereus* akan tampak berbentuk batang besar, gram positif, dengan rantai pendek hingga panjang, spora berbentuk ellips, letaknya ditengah sampai sub terminal dan spora tersebut tidak menggembungkan sporangium;

- f) pindahkan biakan dengan ose 3 mm dari setiap media miring NA ke tabung (13 x 100) mm yang mengandung 0,5 ml BPB kemudian dikocok dengan *vorteks*, untuk mensuspensikan biakan; dan
- g) suspensi biakan ini digunakan untuk uji penegasan *B. cereus* berikut:

A.9.6.6.2 Uji *phenol red glucose broth*

- a) Inokulasikan suspensi biakan dengan menggunakan Ose 2 mm ke dalam 3 ml *phenol red glucose broth* dalam tabung;
- b) inkubasi tabung tersebut secara anaerobik selama 24 jam pada suhu 35 °C dalam tabung anaerobik GasPak; dan
- c) kocok tabung tersebut dengan kuat dan amati pertumbuhan *B.cereus* yang ditandai oleh peningkatan kekeruhan dan perubahan warna dari merah ke kuning yang menunjukkan bahwa asam telah dihasilkan secara anaerobik dari glukosa. Perubahan warna dari merah ke orange/kuning bisa terjadi pada sebagian tabung kontrol yang tidak diinokulasi. Hal ini disebabkan oleh terjadinya pengurangan pH akibat pemaparan media oleh CO₂ yang terbentuk dalam tabung anaerobik GasPak. Gunakan kontrol positif dan kontrol negatif untuk menyakinkan perbedaan antara reaksi positif dan positif palsu.

A.9.6.6.3 Uji *nitrate broth*

- a) Inokulasikan suspensi biakan dengan menggunakan Ose 3 mm ke dalam 5 ml *nitrate broth* dalam tabung;
- b) inkubasi tabung tersebut selama 24 jam pada suhu 35 °C;
- c) untuk uji nitrit, tambahkan 0,25 ml masing-masing pereaksi *sulfanilic acid* dan pereaksi *alfa naftol* ke dalam setiap tabung; dan
- d) warna oranye yang terbentuk dalam 10 menit menunjukkan bahwa nitrat telah direduksi menjadi nitrit.

A.9.6.6.4 Uji media modified VP

- a) Inokulasikan suspensi biakan dengan menggunakan Ose 3 mm ke dalam 5 ml media VP dalam tabung;
- b) inkubasi tabung tersebut selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
- c) untuk uji terbentuknya *acetylmethyl-carbinol*, pipet 1 ml biakan ke dalam tabung uji (16 x 125) mm, tambahkan 0,6 ml larutan *alfa naftol*, dan 0,2 ml KOH 40 %;
- d) aduk dan tambahkan sedikit kristal kreatin;
- e) amati setelah didiamkan selama 1 jam pada suhu ruang; dan
- f) uji positif apabila terbentuk warna merah muda atau violet.

A.9.6.6.5 Uji agar tirosin

- a) Inokulasikan suspensi biakan dengan ose 3 mm ke seluruh permukaan media miring agar tirosin;
- b) inkubasi media miring tersebut selama 48 jam pada suhu 35 °C;
- c) amati zona bening sekitar pertumbuhan bakteri yang terbentuk yang menunjukkan bahwa tirosin telah terdekomposisi; dan
- d) jika hasil uji adalah negatif maka inkubasi dilanjutkan sampai total selama 7 hari sebelum hasil dinyatakan negatif.

A.9.6.6.6 Uji *lysozyme broth*

- a) Inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 2 mm ke dalam 2,5 ml *nutrient broth* yang mengandung lisozim 0,001 % dalam tabung;
- b) inokulasikan juga suspensi biakan ke dalam 2,5 ml *nutrient broth* sebagai kontrol positif;

- c) inkubasi tabung tersebut selama 24 jam pada suhu 35 °C;
- d) uji amati pertumbuhan dalam *lysozyme broth* dan dalam kontrol *nutrient broth*; dan
- e) inkubasi tabung yang negatif selama 24 jam lagi sebelum dibuang.

A.9.6.6.7 Uji agar MYP

- a) Uji ini tidak diperlukan apabila hasil uji telah jelas dengan menggunakan media agar MYP dan tidak ada gangguan dari mikroorganisme yang lain;
- b) bagi bagian dasar cawan Petri menjadi 6 bagian sampai dengan 8 bagian yang sama menggunakan pena penanda;
- c) inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 2 mm disetiap bagian agar MYP tersebut dengan cara menyentuh permukaan agar MYP secara hati-hati. Dalam satu cawan Petri dapat diuji 6 atau lebih biakan;
- d) biarkan inokulum diserap sempurna sebelum diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 35 °C;
- e) amati terbentuknya *lecithinase* yang ditunjukkan oleh zona presipitasi disekitar pertumbuhan;
- f) manitol tidak difermentasi oleh isolat jika media tempat tumbuh dan sekitarnya berwarna eosin merah muda. Warna kuning menunjukkan bahwa asam terbentuk dari manitol; dan
- g) koloni *B. cereus* biasanya positif *lecithinase* dan negatif mannitol pada agar MYP.

A.9.6.6.8 Hasil uji penegasan *B. cereus*

Hasil uji penegasan menunjukkan sebagai *B. cereus* apabila:

- a) Menghasilkan gram positif dengan spora yang tidak sebesar sporangium;
- b) menghasilkan *lecithinase* dan tidak memfermentasikan manitol dalam media agar MYP; tumbuh dan menghasilkan asam dari glukosa secara anaerobik;
- c) mereduksi nitrat menjadi nitrit;
- d) menghasilkan *acetylmethylcarbinol*;
- e) menguraikan L-tirosin; dan
- f) tumbuh dalam media yang mengandung lisozim 0,001 %.

Bibliografi

- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 941.12, Ash of Spices*, 18th Edition, Chapter 43.1.05.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 950.46, Moisture in Meat, Air Drying*, 18th Edition, Chapter 39.1.02.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 963.15, Fat in Cacao Products*, 18th Edition, Chapter 31.4.02.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 974.14, Mercury in Fish, Alternative Digestion Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.24.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 981.10, Crude Protein in Meat*, 18th Edition, Chapter 39.1.19.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 985.16, Tin in Canned Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.35.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18th Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in foods: Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing*, 18th Edition, Chapter 9.1.09.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Aerobic Plate Count*. Chapter 3.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Bacillus cereus*. Chapter 14.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Staphylococcus aureus*. Chapter 12.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*. Chapter 4.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. Chapter 1.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2007. *Salmonella sp.* Chapter 5.
- SNI 7387: 2009. Batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan
- SNI 7388 : 2009. Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan.